Totipotencia, variación y desarrollo clonal de las células cultivadas

F. C. Steward

Hace más de 70 años Haberlandt planteó por vez primera la teoría de la totipotencia, o posibilidad de criar plantas a partir de células vivas aisladas de fanerógamas. La teoría no tuvo en un principio amplia aceptación, debido a la gran dificultad de obtener una satisfactoria confirmación experimental; pero las investigaciones del autor de este artículo y otros científicos en las dos últimas décadas vindican hoy extensamente la precoz profecía.

Concepto de totipotencia celular

Algunos conceptos científicos llegan a aceptarse mucho antes de que pueda demostrarse su practicabilidad. Tal sucedió con el concepto de la totipotencia celular en las plantas superiores. Ya a mediados de nuestro siglo se encontraba uno con la tácita opinión de que, independientemente de las inherentes dificultades prácticas, no había ninguna razón teórica por la que no se pudiese criar una begonia a partir de una célula aislada de un pelo foliar. Esta opinión se basaba, ante todo, en el principio bien establecido de que, al dividirse las células por mitosis, originan ecuacionalmente células hijas semejantes a ellas. En segundo lugar, la idea se debió a la histórica hipótesis lanzada por G. Haberlandt en 1902 (entonces sin apoyo) de que sería posible algún día criar plantas a partir de células aisladas vivas de fanerógamas. (Sobre el papel desempeñado por Haberlandt en la botánica y sobre su artículo de 1902 hay un informe traducido por A. D. Krikorian [3]). La idea de Haberlandt era tanto más notable cuanto que incluso éste afirmó que se desarrollarían asexualmente «embriones artificiales» a expensas de células somáticas vivas. Sin duda, esta opinión de Haberlandt estaba fuertemente influida por el conocimiento de muchos casos de «embriones» desarrollados *in situ*, en las plantas superiores, a partir de células somáticas adecuadamente estimuladas y sin que hubiese existido un acto sexual previo. De hecho, Haberlandt dedicó gran atención a estos hechos en sus trabajos posteriores [2]. Aunque hoy sus profecías se han cumplido, el problema ha adquirido un interés más amplio, porque el principio se está extendiendo anticipadamente y, a menudo, más allá de las pruebas existentes, al desarrollo clonal de las células somáticas vivas de los animales superiores, el hombre incluido.

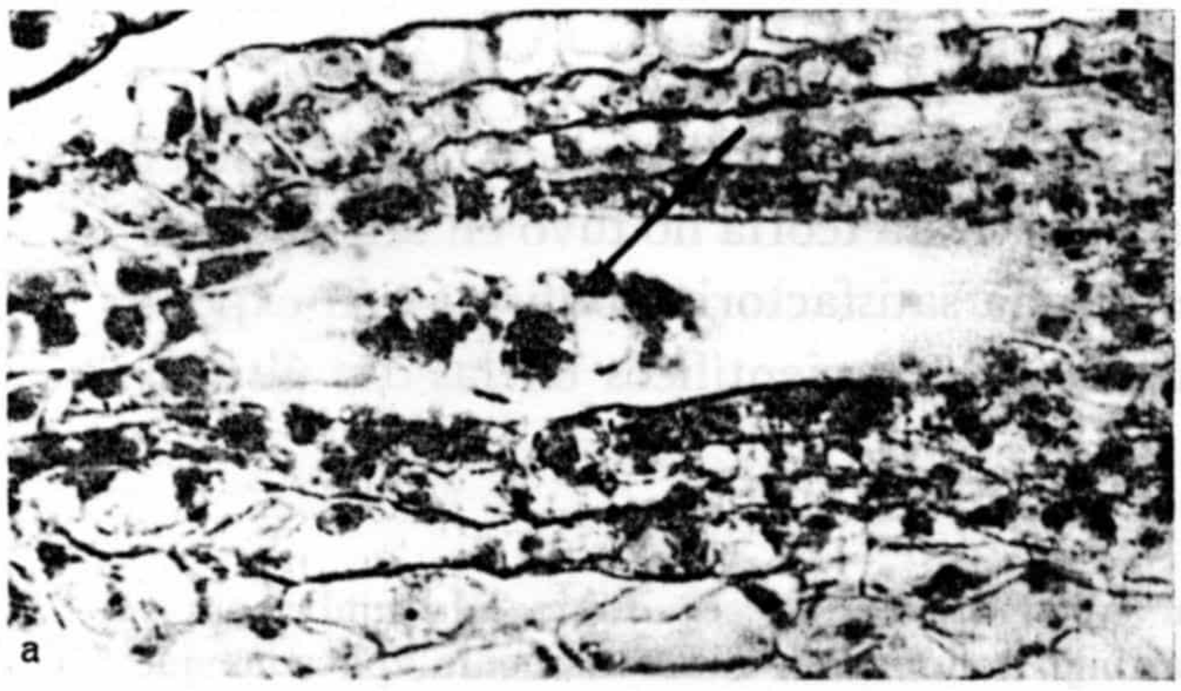
En un principio, la significación especial del zigoto (oosfera fecundada) en las plantas se restringió a su papel como único producto genético de la fusión de los gametos masculino y femenino. Establecida la constitución genética de un individuo dado, el zigoto se comporta, en cuanto a su desarrollo, como una célula viva de carácter muy general: una célula con capacidad «constructiva» para crecer en un órgano, el óvulo, que favorece tal crecimiento (Fig. 1). Además, y como se demostrará en un más que satisfactorio número de casos, las células somáticas aisladas pueden retornar a un estado similar al zigótico y crecer originando embriones y plantas bajo condiciones adecuadamente aplicadas que suministren los alimentos y estímulos requeridos.

Contrastes entre las células animales y vegetales

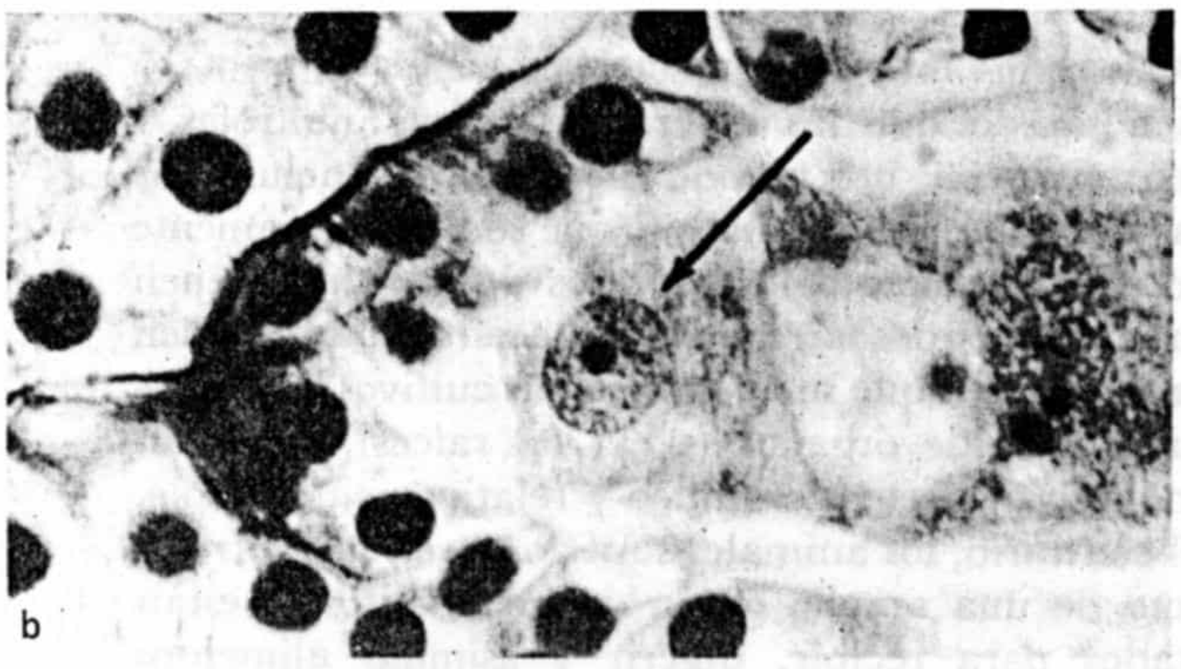
Es bien sabido que las fanerógamas son autótrofas y pueden vivir en un mundo inorgánico. Incluso las células no verdes de las plantas, que son necesariamente heterótrofas respecto a los hidratos de carbono, tienen sus otras necesidades tan sencillas que, a menudo, pueden desarrollarse, aunque sea despacio, en cultivos de tejidos explantados o de órganos (p.ej., en raíces), sobre un medio en gran parte inorgánico y relativamente simple. Por el contrario, los animales superiores son heterótrofos respecto de una amplia gama de metabolitos, y están adaptados para recibir, digerir y asimilar alimentos procedentes de fuentes muy complejas y para que la sangre los distribuya a las células y a los órganos del cuerpo mediante un complicado proceso que no tiene paralelo en los vegetales. Además, el organismo animal crea y mantiene entre límites estrechos un medio interno que actúa sobre sus células vivientes y que les suministra lo que necesitan en una forma relativamente concentrada. Las células vegetales, por el contrario, pueden siempre obtener sus alimentos a partir del mundo exterior (CO_2 y H_2O, NO_3, SO_4 y PO_4 y elementos en forma mineral), donde se hallan muy diluidos; pueden, además, sobrevivir a variaciones muy amplias en la composición del medio ambiente. No obstante, las células somáticas de las plantas mantienen relativamente constante la composición de sus fluidos internos. A diferencia de las células animales, las vegetales están encerradas en una pared celulósica, por lo que pueden utilizar su turgidez para mantener un delgado revestimiento protoplásmico en torno a las grandes vacuolas que contienen; esta delgada capa viva establece, sin embargo, un fácil contacto con el aire o medio exterior, con el que las células vegetales realizan un constante intercambio. Cuando un embrión de mamífero se desarrolla a partir de un zigoto, establece rápidamente un complejo suministro de alimentos con la madre a través de la placenta, o, en otros casos, el embrión desarrolla primeramente una forma larval libre sobre la base de los alimentos prealmacenados en el zigoto. En cambio, en una planta superior, el suministro de alimentos (vía endospermo) al embrión contenido en el saco embrionario del óvulo es más sencillo debido a que su sujección en éste se hace por medio de un suspensor que cumple una misión mucho más mecánica, mientras que el proembrión y sus cotiledones, de formación posterior, absorben directamente alimentos y estímulos por sus superficies externas. Así, pues, supuesto posible inducir a las células somáticas de una planta para que formen embriones inmaturos, el suministro de alimentos a éstos desde el exterior resultará

F. C. Steward

Nació en Inglaterra en 1904 y estudió en las Universidades de Leeds y Londres. Tras unos periodos de investigación en los EE.UU., se afincó allí definitivamente, en 1946, como profesor e investigador de la Universidad de Rochester. Ha sido Catedrático de Botánica desde 1950 en la *Cornell University*, y en 1965 fue nombrado primer Catedrático de Ciencias Biológicas en la misma universidad. Dirige el Laboratorio de fisiología, crecimiento y desarrollo celulares, del *New York State College (Cornell University)*, que lleva a cabo la investigación básica. Ha publicado abundantes trabajos sobre metabolismo, crecimiento y organización de las plantas.



a



b

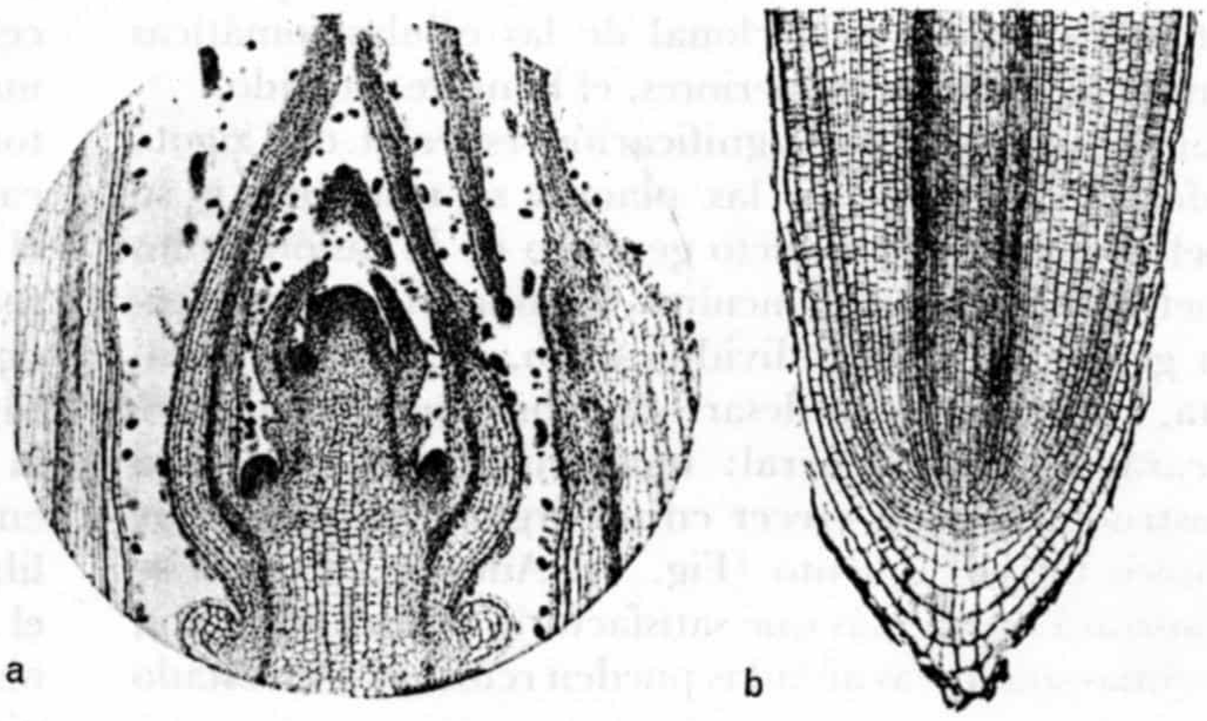
Figura 1 La oosfera, indicada por una flecha, en el saco embrionario, dentro del óvulo de las fanerógamas. Obsérvese cuán parecidas son las oosferas de diferentes plantas: a) *Capsella*, b) *Lilium*. (×250)

mucho más fácil que para los embriones de los animales superiores, que precisan un aporte de sangre. Esto puede explicar el hecho de que los teratomas testiculares del ratón [4] no se desarrollen cuando les falta riego sanguíneo. Estas estructuras originan, sin embargo, una aparente embriogenia; en realidad, son conocidas desde hace tiempo formas asexuales parecidas en otros animales [5]. Por el contrario, y como se verá más adelante, es posible conseguir hoy que proembriones de diversas plantas, originados a partir de células somáticas libres, formen embriones y plántulas a millares. Esto sucede incluso en aislamiento y en un volumen limitado de una adecuada solución acuosa que, en este respecto, se comporta como un óvulo o un saco embrionario artificiales.

Todavía hay otra razón obvia para que el desarrollo totipotente a partir de las células somáticas sea más factible en las plantas que en los animales superiores: éstos desarrollan sus órganos muy precozmente, les asignan funciones sumamente especializadas y luego integran sus actividades por medio de la sangre que circula, de un sistema nervioso (con encéfalo y médula), y de hormonas muy especializadas elaboradas por glándulas discretas. Además, estos fenómenos del desarrollo sólo suelen producirse una vez en los animales, mientras que las plantas superiores crean órganos repetidas veces; con frecuencia, en un proceso virtualmente sin fin. Los vegetales consiguen esto disponiendo, en sus zonas de crecimiento, células vivas que conservan las características esenciales de la planta y que, durante el desarrollo, parten de la situación que se observa en los meristemos apicales primarios del tallo y de la raíz, o bien vuelven a dicha situación a través de etapas relativamente cortas y, a menudo, reversibles. La Fig. 2 muestra la organización de un ápice caular y de otro radicular para señalar el crecimiento no restringido y la formación repetida de órganos, así como la existencia de numerosos puntos del cuerpo de la planta en los que existen células vivas y de los cuales éstas pueden explantarse para ser cultivadas. Así, pues, la organización, nutrición y fisiología celular de las plantas y de los animales superiores son muy diferentes en el sentido de que el desarrollo clonal de los vegetales en gran número a partir de células libres es mucho más factible, hasta ahora, que el de los animales.

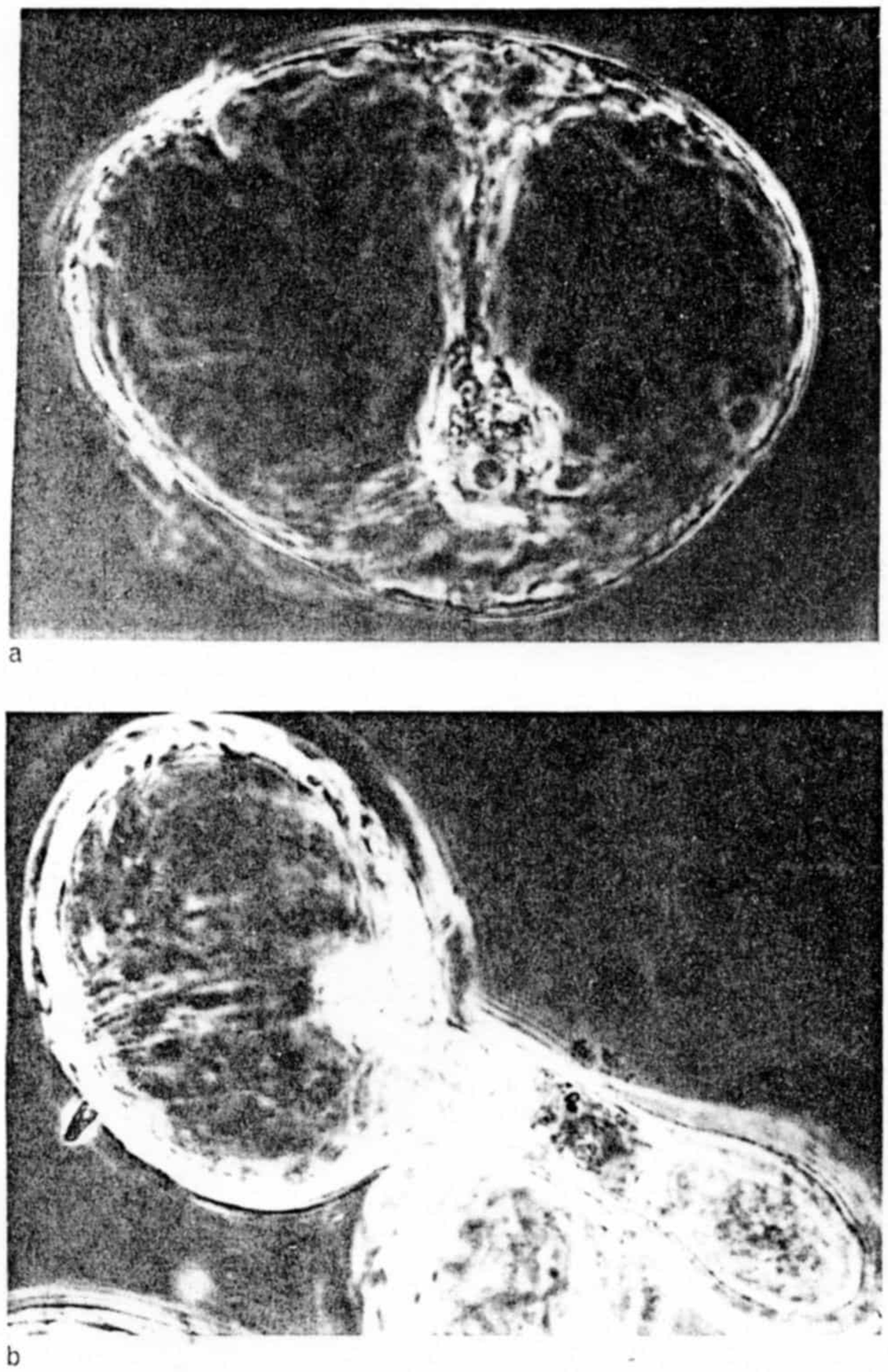
Diversidad de células parenquimatosas vegetales

Admitimos que toda célula somática de una angiosperma derivada del zigoto por divisiones ecuacionales, posee la información genética completa de aquél, pese a lo cual, hasta las células vivas no especializadas (las parenquimatosas) despliegan una sorprendente gama de características, incluso dentro del mismo tejido. Muchos ejemplos podrían citarse. Las células parenquimatosas vivas de *Pellionea* muestran, según su localización, abundancia de cloroplastos verdes, amiloplastos con granos de almidón, inclusiones cristalinas (drusas) en células en otro caso incoloras, vacuolas teñidas de rojo por la antocianina en células regularmente dispersadas por otros parénquimas, y, finalmente, células agrandadas subepidérmicas en hojas que contienen grandes cistolitos calcificados. Así este caso extremo de especialización fisiológica (*cf.* Fig. 5 (a–d)) implica un control selectivo local sobre la información genética que presumiblemente contiene cada célula. Ahora bien, cuando por medios adecuados se cultiva tejido de *Pellionea*, y sus células crecen libres de todo contacto con su tejido de origen, ellas exhiben características del todo diferentes y menos especializadas desde el punto de vista de su desarrollo (Fig. 3 (a, b)). Así, pues, lo que las células hacen *in situ*, esto es, su diversificación bioquímica y fisiológica, es la consecuencia de lo que son, no sólo genética, sino también morfológicamente. Pero no es preciso ir más allá del espectacular ejemplo ofrecido por las células del cambium vascular (*cf*, Fig. 6) en un vegetal, como, p.ej., el tilo (*Tilia*). El cambium de éste



a b

Figura 2 Cortes longitudinales del tallo a) y de la raíz b) de la menta *(Mentha piperita)*. a) Apice caular con series de esbozos foliares originados por pares opuestos y con yemas en las axilas; obsérvense también los cordones del procambium que descienden por debajo de las hojas jóvenes, y las células adyacentes a ellos, que se diferencian y maduran; b) la organización del ápice de la raíz es completamente distinta, aunque las células individuales poseen sus réplicas en el ápice del tallo. a (×40); b (×150)



a

b

Figura 3 Células cultivadas de *Pellionea*. a) Una célula suspendida libremente y a punto de dividirse. b) Formaciones asimétricas producidas por la división de una célula de ese tipo. (×575)

forma un xilema interno (traqueidas, vasos o parénquima leñoso) y un floema externo (tubos cribosos, células acompañantes, fibras y parénquima), y, localmente, radios uniseriados (en el leño) y esparcidos (en el floema). Pero, cuando tales células del cambium se desarrollan asépticamente pueden originar una masa suelta y proliferada por el cultivo. De hecho, los precursores de los cultivos de tejidos vegetales hicieron a menudo, consciente o inconscientemente, numerosos de tales cultivos de tejidos proliferantes de dicotiledóneas a partir de explantes de tejidos en los que las células más capaces de dividirse eran las de las zonas del cambium.

Inducción del crecimiento en células maduras quiescentes

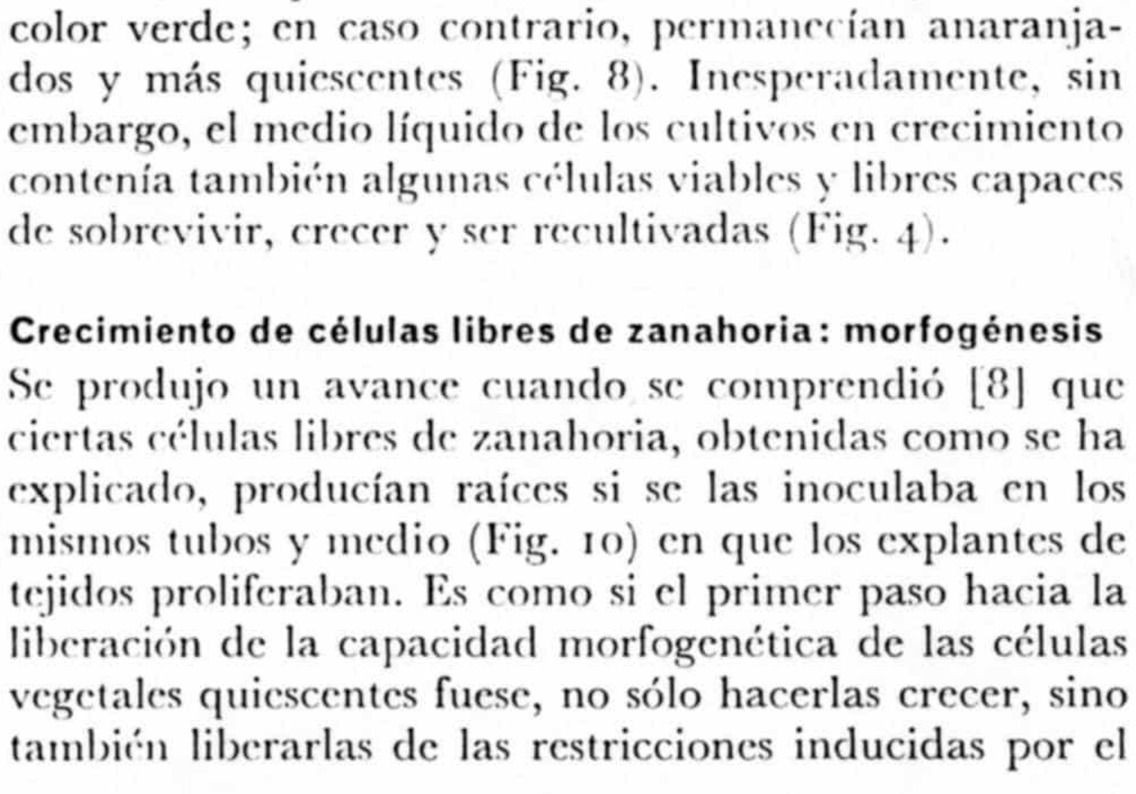
Sin embargo, fue estudiando la inducción del crecimiento en células lo bastante alejadas del cambium como para que normalmente no volviesen a dividirse como se logró un conocimiento más reciente de las condiciones que provocan el máximo crecimiento de células (en otro caso quiescentes) de los tejidos maduros del organismo vegetal. Tal estudio se realizó por vez primera a finales de 1940, utilizando minúsculos explantes de tejidos (de 2,5 mg) pertenecientes al floema secundario de la raíz de zanahoria [6].

Estos explantes, sometidos asépticamente a un medio líquido basal con todos los alimentos ostensiblemente necesarios para su desarrollo (sales, azúcares y vitaminas), crecieron con lentitud y, principalmente, por expansión celular, y sus células retuvieron durante tres o más semanas su color inicial rojo anaranjado (Fig. 7), incluso a la luz difusa. Por el contrario, cuando se sometieron otros explantes similares al mismo medio, pero completado con un líquido capaz de alimentar a un embrión, que de otro modo no maduraría, p.ej., con leche de coco (parte líquida del endospermo de éste), dichos explantes crecieron rapidísimamente [7] y se volvieron verdes (Fig. 7). Estos explantes de tejidos se cultivan hoy aislados o en multiplos de tres, en tubos, o en hornadas de 100, en frascos (Fig. 8), que se someten a una lenta rotación (1 rpm), extremo con extremo, de modo que queden alternativamente expuestos al medio líquido (10 ml) y al aire. El crecimiento proliferador desorganizado que se produce seguidamente es rápido, a menudo con un aumento de 80 veces el peso fresco en 20 días y un incremento desde unas 25 000 células hasta 2,5 millones. Es importante que la especial combinación de alimentos y estímulos que restauró tan rápido crecimiento en las células maduras de la zanahoria es la misma que también sirve de alimento a los embriones no maduros, porque los mismos nutrientes han representado también un papel en la iniciación del crecimiento de las células libres capaces de desarrollarse dando embriones.

Primeramente se obtuvo una gran cantidad de células de zanahoria libres y viables, y se las recultivó en frascos «nodriza», giratorios también, y diseñados especialmente para contener numerosos explantes proliferados de zanahoria, de 50 a 100 en cada recipiente, y en 250 ml de medio de cultivo. Cuando este medio contenía leche de coco, los explantes crecían uniformemente y tomaban color verde; en caso contrario, permanecían anaranjados y más quiescentes (Fig. 8). Inesperadamente, sin embargo, el medio líquido de los cultivos en crecimiento contenía también algunas células viables y libres capaces de sobrevivir, crecer y ser recultivadas (Fig. 4).

Crecimiento de células libres de zanahoria: morfogénesis

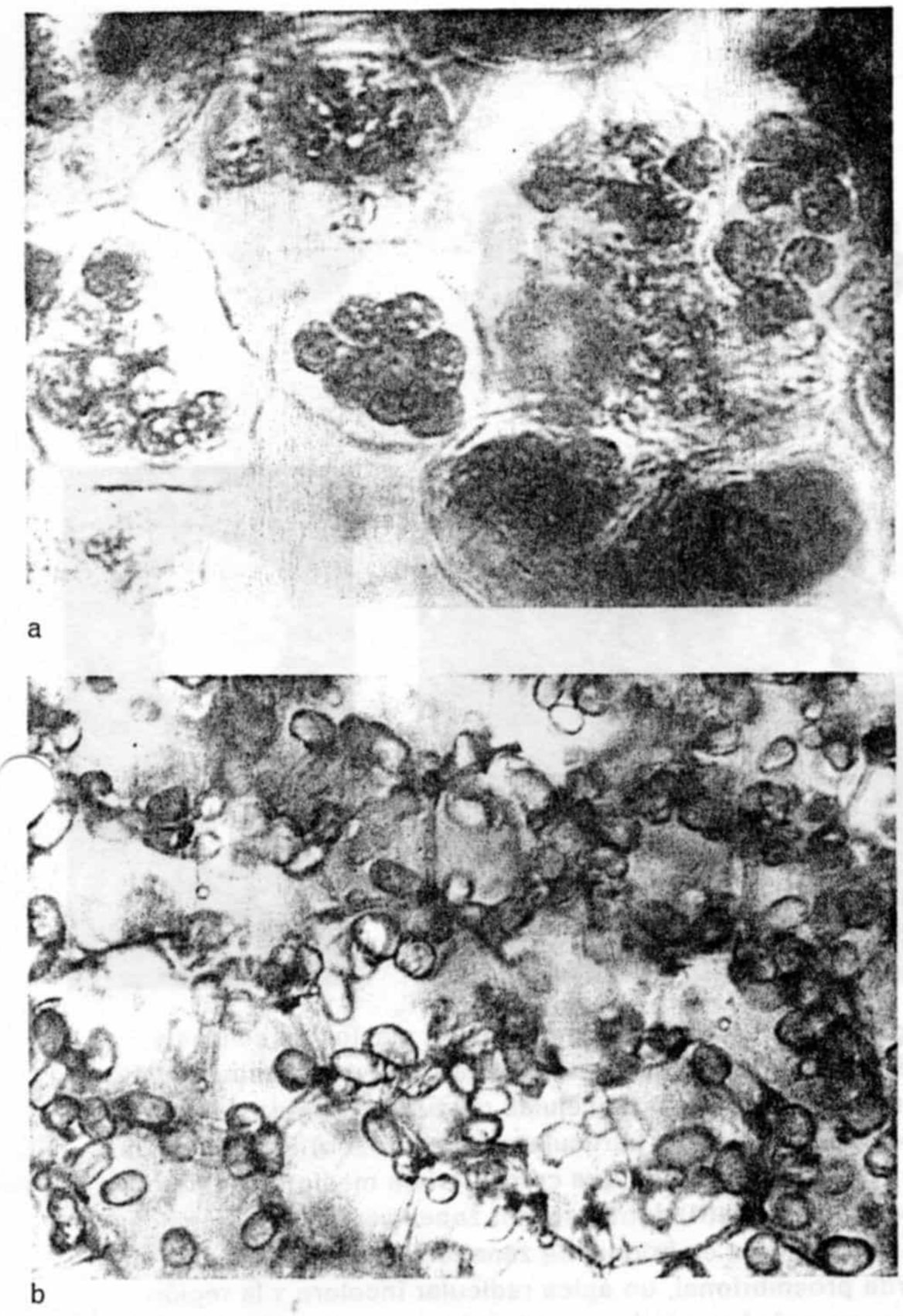
Se produjo un avance cuando se comprendió [8] que ciertas células libres de zanahoria, obtenidas como se ha explicado, producían raíces si se las inoculaba en los mismos tubos y medio (Fig. 10) en que los explantes de tejidos proliferaban. Es como si el primer paso hacia la liberación de la capacidad morfogenética de las células vegetales quiescentes fuese, no sólo hacerlas crecer, sino también liberarlas de las restricciones inducidas por el



a

b

Figura 4 Célula de zanahoria suspendida libremente b) en un cultivo de células libres originado en medio de cultivo similar al de la Fig. 8 (b) inoculado con células de raíz de zanahoria (4a). a (×375); b (×150)



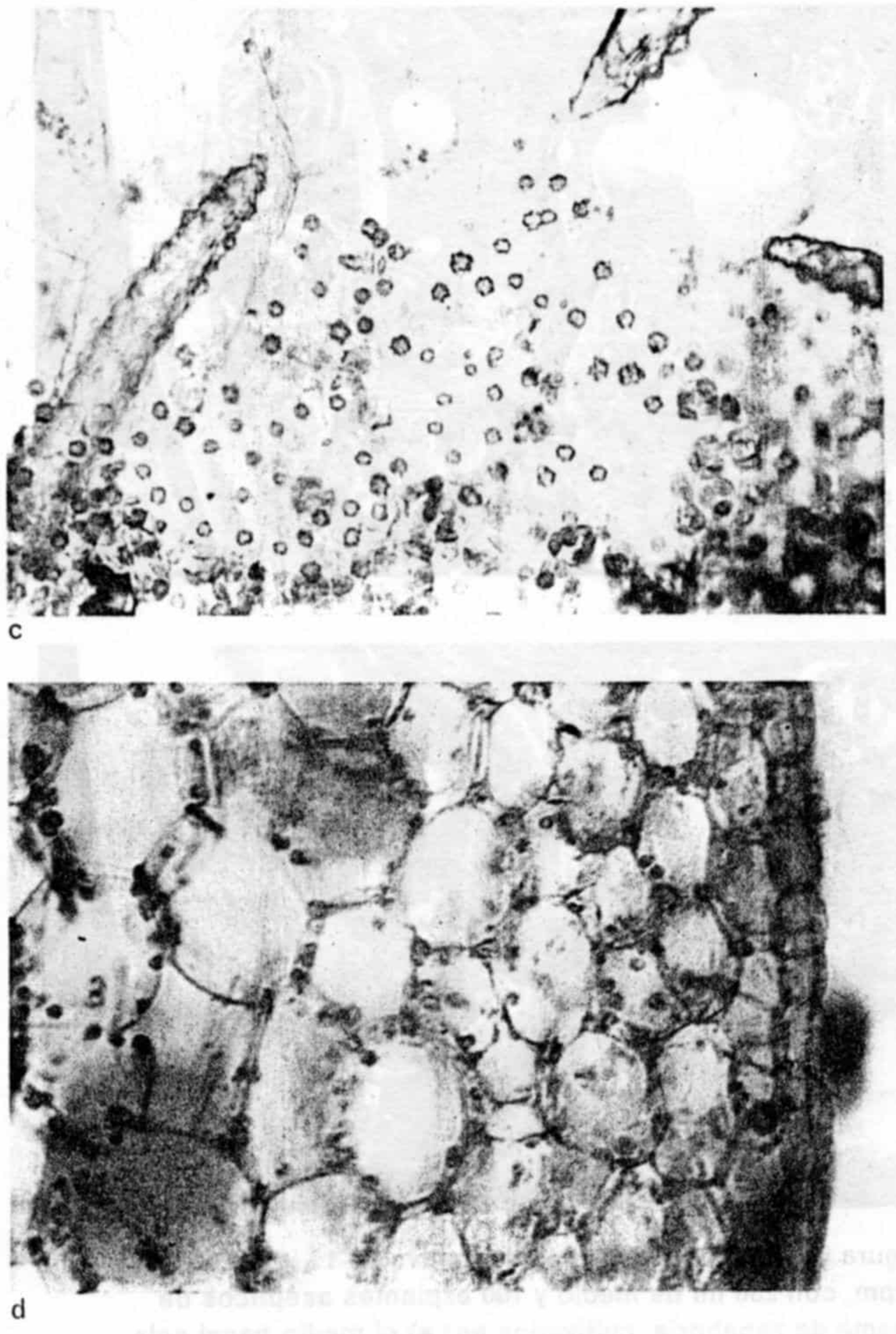


Figura 5 (a–d) Cortes de *Pellionea* hechos a mano, suficientemente gruesos para mostrar profundidad, y fotografiados vivos para poder apreciar las características de la diferenciación fisiológica y bioquímica en las células del parénquima. (×225)

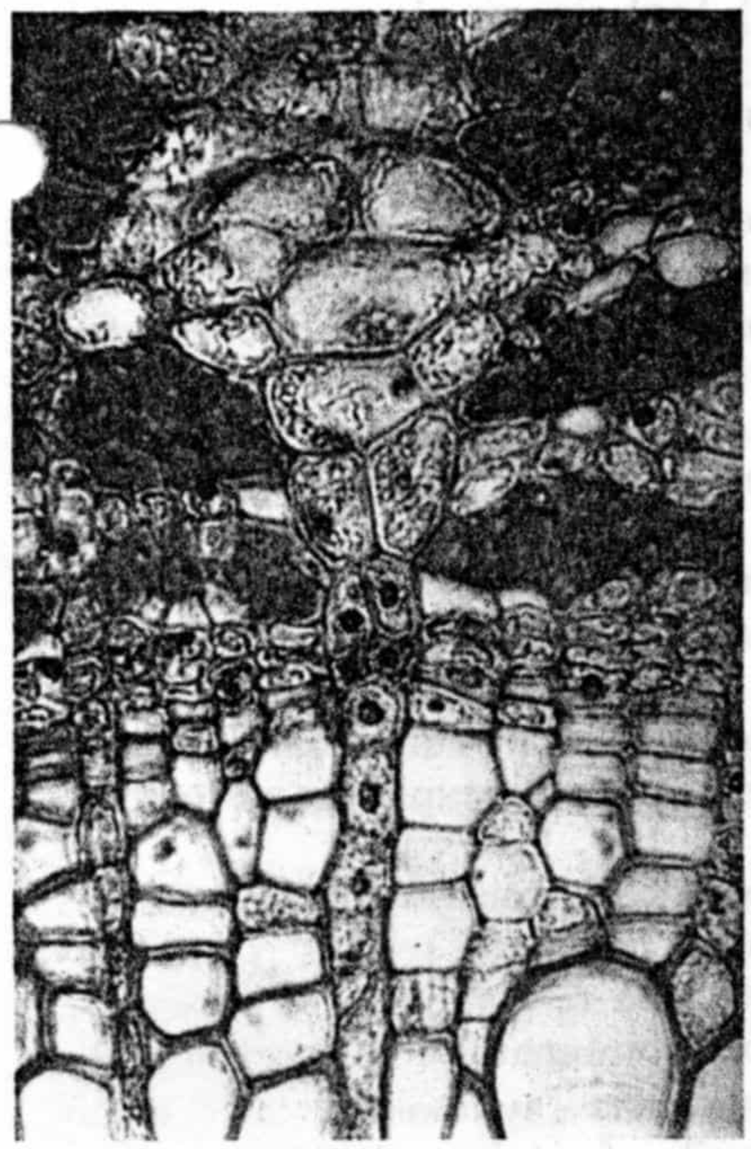


Figura 6 Corte preparado y teñido para mostrar en el tilo *(Tilia)* la región del cambium y sus derivadas. (×225)

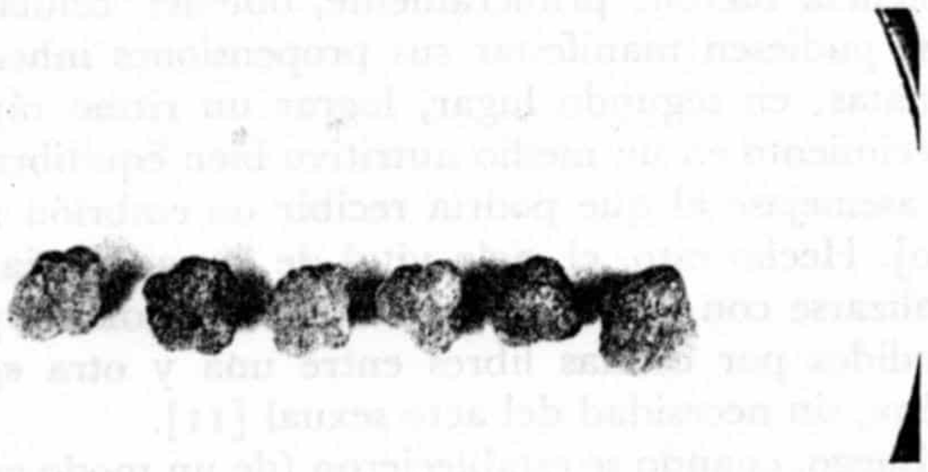
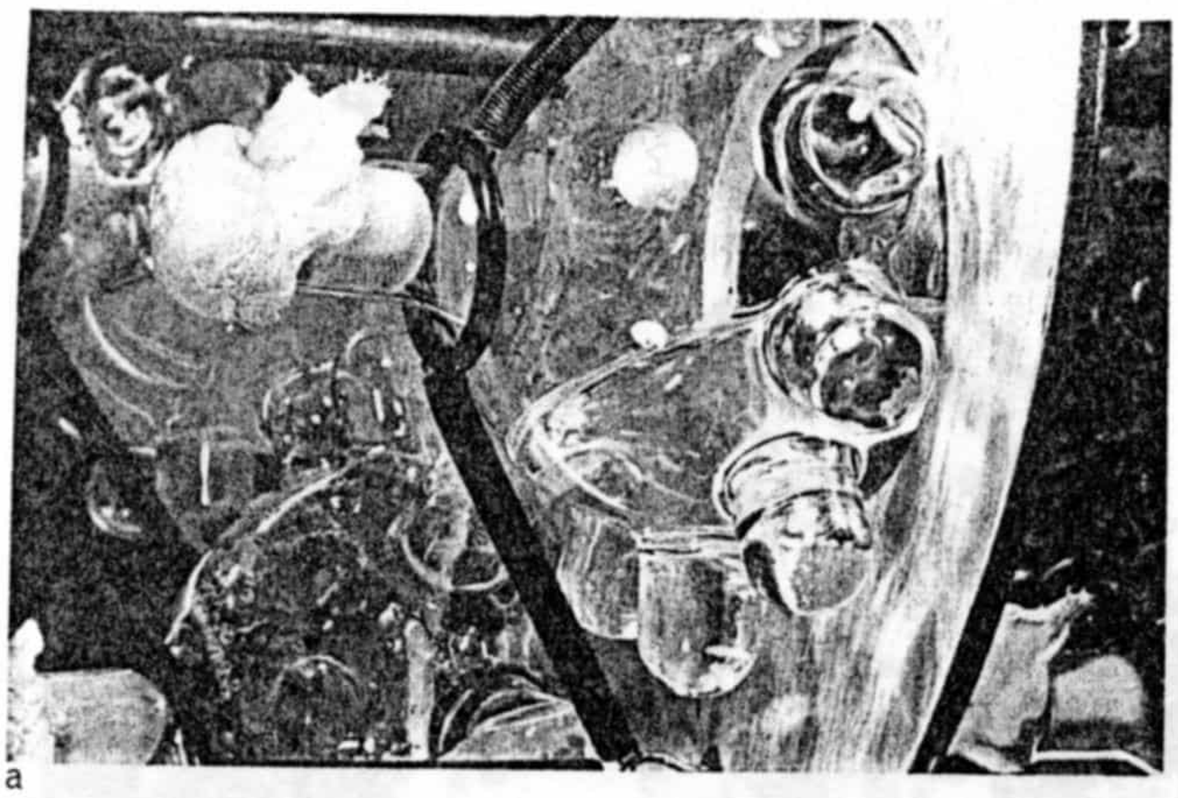
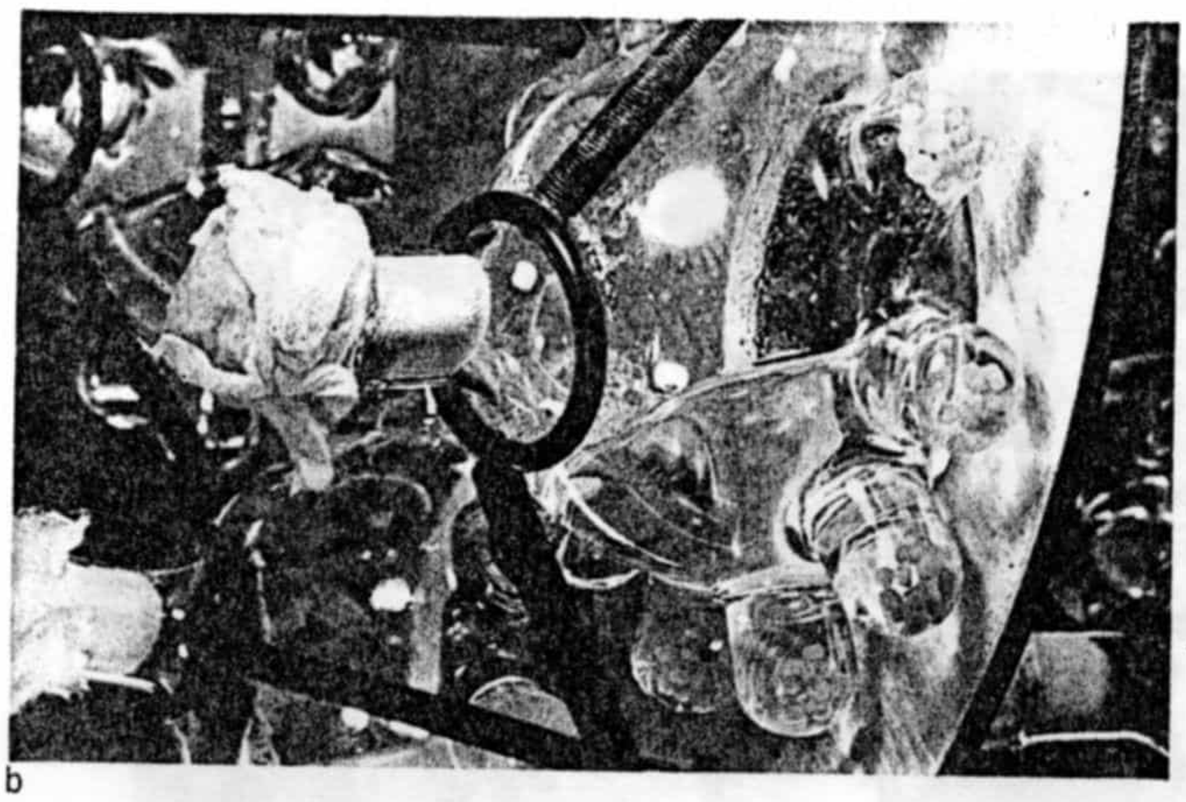


Figura 7 Explantes de floema de zanahoria luego de cultivados a la luz en un medio líquido basal (color naranja), y en el mismo medio completado con leche de coco al 10% en v. (color verde). (×0,8)

contacto orgánico con su tejido de origen. En realidad, sólo fue un pequeño avance para mostrar que las células libres de zanahoria crecen de un modo organizado, y que los grupitos celulares que pueden formar raíces espontáneamente también desarrollan tallos en un medio de agar [9]. De este modo se formaron numerosos embrioides (muy parecidos a embriones zigóticos) que se transformaron en plántulas y luego en plantas normales con reservas, raíces ricas en caroteno y, posteriormente, flores. Hasta este punto se vindicó la doctrina de la totipotencia de las células pertenecientes al floema secundario de la raíz de zanahoria y de su capacidad para regenerar embriones y plantas. Los



a



b

Figura 8 Frascos especiales de cultivo de 1 l, girados a 1 rpm, con 250 ml de medio y 100 explantes asépticos de floema de zanahoria, cultivados en: a) el medio basal solamente; b) el mismo más leche de coco. (×0,3)

a

b

c

Figura 9 Desarrollo de pigmentos en plastos de células y plántulas cultivadas de zanahoria. a) Cultivo verde desorganizado, crecido a partir de células del floema de raíz de zanahoria; es una estirpe particularmente verde. b) Plántulas que se organizan a medida que crecen en un medio de agar sobre una placa de Petri, donde se ven zonas verdes y anaranjadas. c) Una plántula embrional de zanahoria que muestra el brote verde proembrional, un ápice radicular incoloro y la región rojo anaranjada de la futura raíz tuberosa. a (×0,5); b (×50); c (×60).

requerimientos esenciales para actualizar dicha totipotencia fueron: primeramente, obtener células libres que pudiesen manifestar sus propensiones inherentes e innatas; en segundo lugar, lograr un ritmo rápido de crecimiento en un medio nutritivo bien equilibrado que se asemejase al que podría recibir un embrión zigótico [10]. Hecho esto, el ciclo vital de la zanahoria podría realizarse con éxito y repetidamente, mediante puentes tendidos por células libres entre una y otra «generación», sin necesidad del acto sexual [11].

Luego, cuando se establecieron (de un modo esencialmente similar) cultivos de células libres a partir de un embrión de zanahoria disecado de una semilla no madura, se produjeron dos desarrollos espectaculares [12]. Primero, la suspensión filtrada de células de zanahoria originó, en medio de agar sobre placa de Petri, gran número (del orden de 10^5) de estructuras embrionarias organizadas; segundo, la suspensión celular dio lugar a muchos cúmulos celulares, pequeños y de forma globular, que se comportaron precisamente como proembriones, ya que pasaron por una estricta serie de fases embrionarias, formando sucesivos embriones en forma de corazón, de torpedo y cotiledónicas, similares a las que se originan de los zigotos en los óvulos. Así, mientras las primeras células libres de los explantes de floema alcanzaron un estado pluricelular por diversos caminos y, a partir de él formaron estructuras organizadas que produjeron raíces y brotes, los cúmulos celulares procedentes de células isodiamétricas de los cultivos de origen embrionario recapitularon fielmente la embriogenia (Fig. 12 (a–h)) [12] sin ningún proceso sexual preliminar. Todo ello no fue, empero, sino el preludio a los métodos corrientes mediante los cuales las células de zanahoria y de otras plantas pueden hacerse crecer y multiplicar como los microorganismos, para luego estimular convenientemente su crecimiento hasta formar millares y constituir precisas réplicas de embriones, que originan poblaciones normalmente clonales de plantas (Fig. 13). Así se ha cumplido ampliamente la profecía de Haberlandt para la zanahoria y otros vegetales [13].

La embriogénesis en los cultivos de células libres

Otros enfoques han extendido el uso de las especiales cualidades de la leche de coco, las cuales, no es preciso decirlo, no actúan por sí solas ni con iguales efectos espectaculares sobre toda clase de explantes de tejidos vegetales.

El primero de ellos surgió al observar que algunos de los más recalcitrantes explantes de tejidos (p.ej., del tubérculo de la patata) sólo respondían con un crecimiento proliferante bajo combinaciones sinergísticas de leche de coco con sustancias auxinoides, tales como 2-4-D ó el ácido acetil-naftalénico (AAN) en bajas concentraciones (del orden de 5 a 10 ppm) [14]. Se dilucidaba mientras tanto, la identidad de estímulos del crecimiento más específicos de los endospermos líquidos [15] y se veía que sus efectos también procedían de combinaciones sutiles de diversas sustancias reguladoras

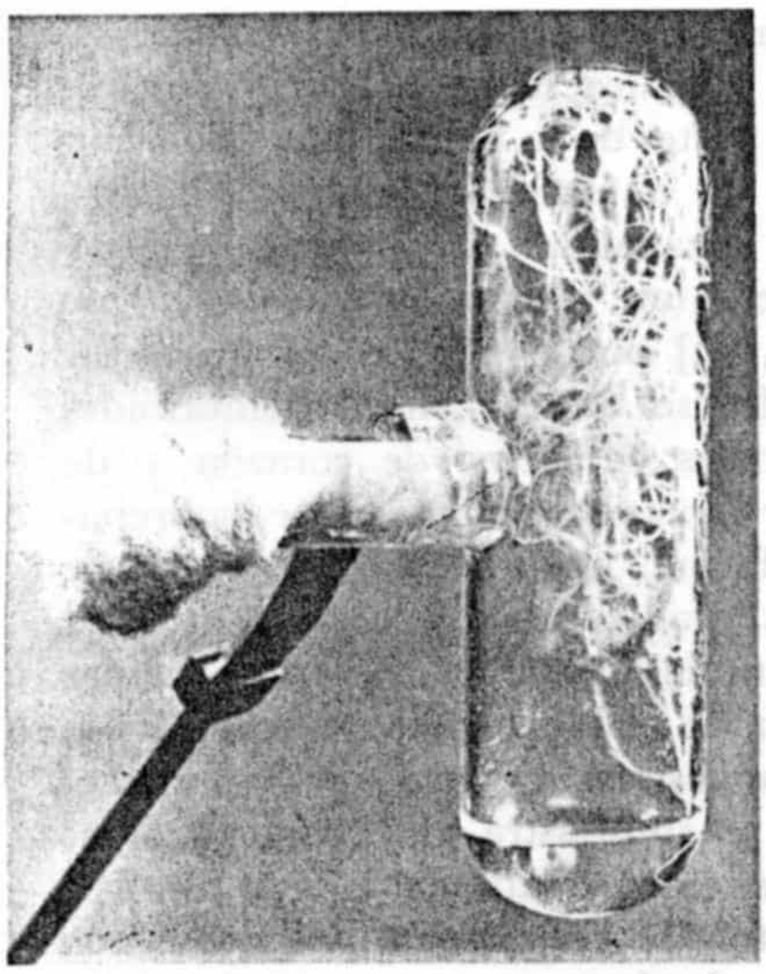
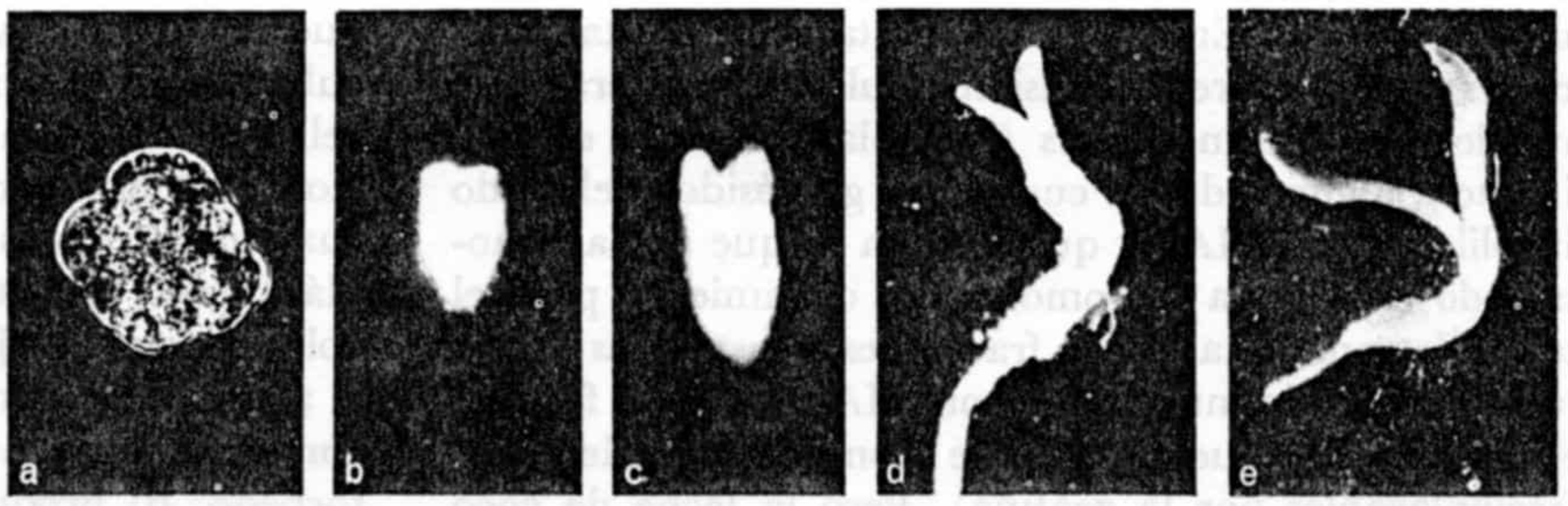


Figura 10 Primera producción de raíces de zanahoria a partir de células libres, en un tubo y con un medio en el cual proliferan los explantes, *cf.* Fig. 7. (×0,5)



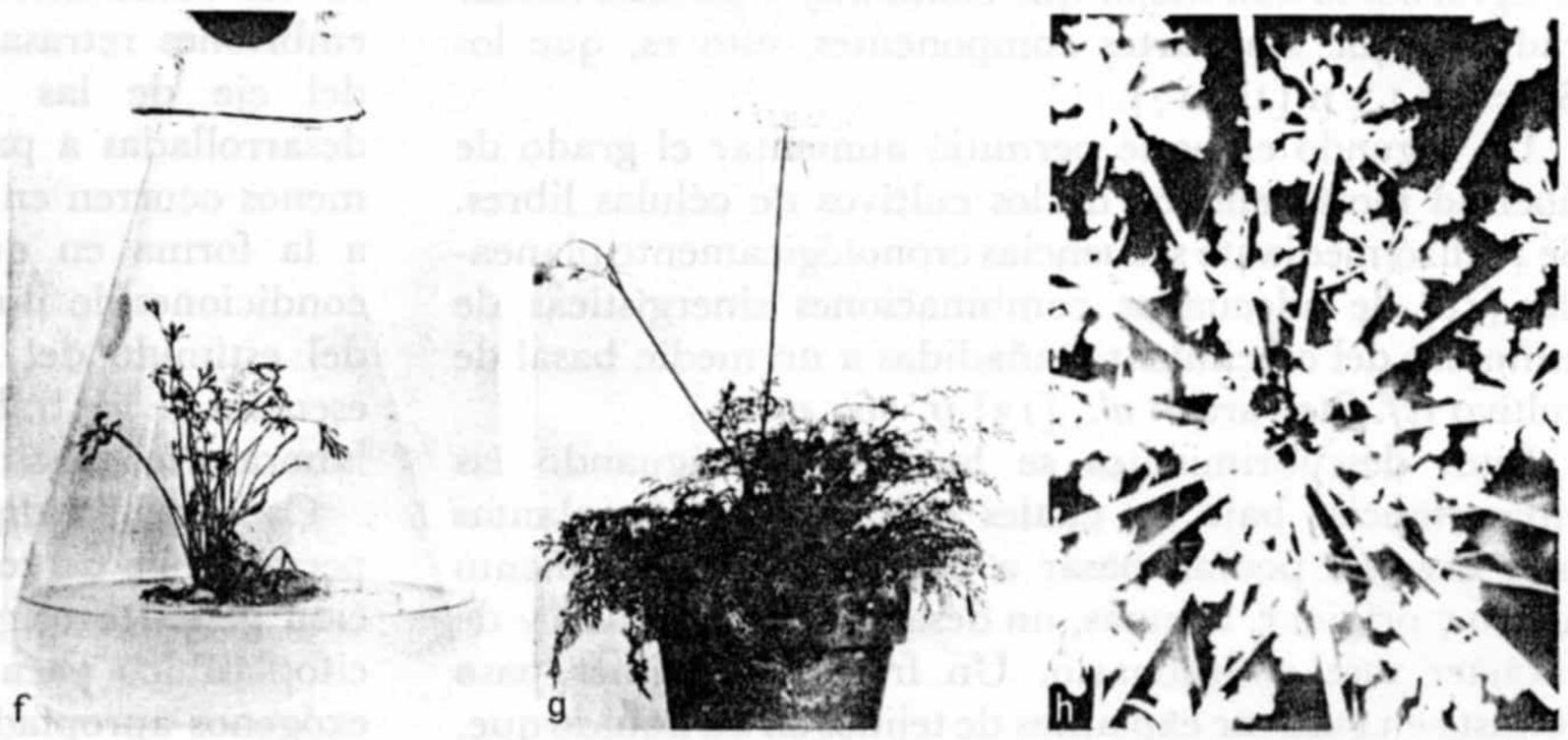
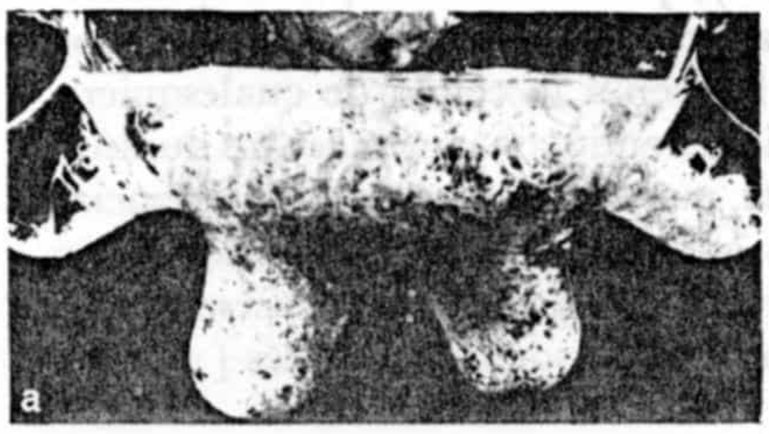
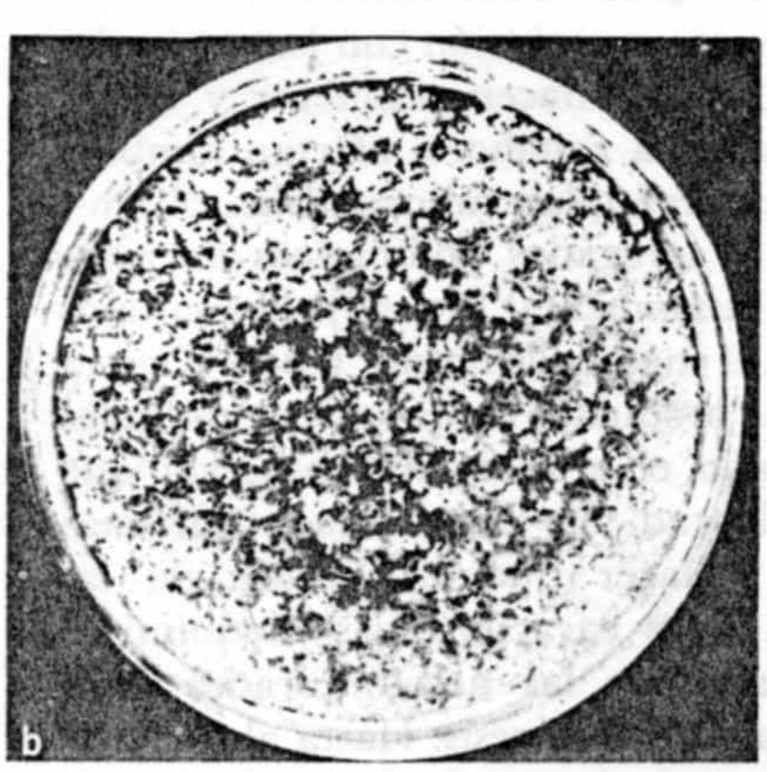


Figura 12 Desarrollo embrionario de plantas de zanahoria procedentes de células libres cultivadas. a–e) Fases que van desde un proembrión globular hasta la existencia de cotiledones; f–h) crecimiento sucesivo de las plantas hasta la floración. (Fot. de Steward *et al*; *Science, N.Y.*, **143**, 20, 1964.)





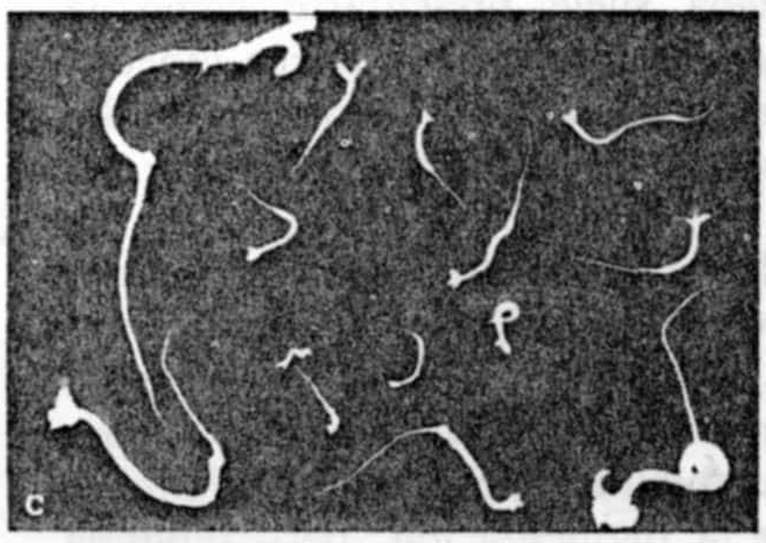


Figura 11 Una «cosecha» de plántulas de chirivía acuática *(Sium suave)*, desarrollada a partir de células libres cultivadas. a) La cosecha en el frasco de cultivo. b) Una muestra en una placa de Petri. c) Algunas plántulas representativas.

Figura 13 Vista microscópica representativa de una porción aislada de un frasco de cultivo (*cf.* Fig. 8), en la cual se ha desarrollado y crecido gran número de embriones y plantas a partir de células libres. Obsérvense los pequeños embriones en forma de corazón y de torpedo, así como las plántulas jóvenes.

del crecimiento. Entre éstas se destacaron ciertas fracciones activas sobre la división celular, que interactúan con los hexitoles naturales (reemplazables por el *myo*-inositol), algunos de los cuales son glucósidos del ácido indolil-acético (AIA) y que forman lo que se ha denominado el Sistema I promotor del crecimiento para el tejido de zanahoria. Otras fracciones y sustancias deben su actividad a la interacción con AIA exógeno y forman el Sistema II, que consta de compuestos adenílicos (reemplazables por la zeatina). Pero la leche de coco integral actúa aun mejor que como mejor puedan actuar cada una de sus partes componentes, esto es, que los Sistemas I y II [16, 17].

Un segundo enfoque permitió aumentar el grado de libertad morfogenética de los cultivos de células libres. Se realizó mediante secuencias cronológicamente planeadas [18] de adecuadas combinaciones sinergísticas de estímulos del crecimiento, añadidas a un medio basal de cultivo (*cf.* Steward *et al.*, [13] p. 360 *et seq.*).

Estos descubrimientos se hicieron averiguando las circunstancias bajo las cuales células libres de plantas muy diversas podían pasar a un estado de crecimiento activo y originar, además, un desarrollo organizado y de carácter más embrionario. Un frecuente primer paso consiste en cultivar explantes de tejidos en un líquido que, por cualquier medio, produzca un crecimiento muy rápido. Esto se consiguió a menudo completando el medio basal (B) con leche de coco (LC) (del 5 al 10% en volumen) y AAN (de 5 a 10 ppm): con frecuencia las células libres se multiplicaban también en el mismo medio. A partir de aquí, sin embargo, las células incipientemente organizadas, cúmulos celulares, pudieron transferirse a otros medios líquidos en los frascos nodriza, donde crecieron espontáneamente de un modo embrionario. Se han ensayado varias combinaciones y secuencias, demasiadas para poderlas mencionar aquí, pero algunos ejemplos nos permitirán ilustrar cómo los principios del «efecto secuencial» surgieron de tratamientos empíricamente ensayados.

Otras plantas de la familia de la zanahoria, notablemente la chirivía acuática (*Sium suave*), han respondido a tales tratamientos, como lo demuestra la copiosa producción de plántulas procedentes de los cultivos de células libres que se ven en la Fig. 11 (a, b, c). Un cultivo de tabaco (*Nicotiana suaveolens*) produjo excelentes células libres en un medio B+LC+AAN, las cuales se desarrollaron a continuación morfogenéticamente en un medio B+LC, produciendo una planta con flor más rápidamente que si se hubiese originado de una semilla [18]. De igual modo, las células libres cultivadas de una orquídea del gén. *Cymbidium*, obtenidas de un único explante de meristemo, produjeron primero procmbriones, luego protocormos y después plántulas, según la secuencia: explante de tejido→medio basal, agar+LC+AAN→medio líquido B+LC+AAN ó 2-4-D→B+LC→B. Los cultivos celulares derivados hasta del polen han originado recientemente embriones, primero, y plantas, después [19, 20], como ya se logró con trabajos aún más antiguos (*cf.* [21]).

No existe, sin embargo, regla general alguna respecto a los métodos para realizar la embriogénesis a partir de células somáticas libres, ya que cualesquiera de los muchos casos aún recalcitrantes puede requerir combinaciones y secuencias de estímulos nutricionales y ambientales todavía no ensayados. De hecho, se sabe que, incluso la favorabilísima situación de la zanahoria cultivada, solamente produce tejido activo y cultivos celulares de distintas partes de la planta bajo combinaciones determinadas de estímulos exógenos. Además, cuando las células de la zanahoria originan embriones y plántulas, constituyen un sistema plástico al que voluntariamente [22, 23] puede hacerse: a) proliferar al azar; b) formar raíces sin brotes; c) formar embrioides con embriones normales en forma de corazón y de torpedo; d) producir hipocótilos alargados; e) sobrepasar los cotiledones y formar hojas divididas; f) producir embriones retrasados y adventicios, incluso a lo largo del eje de las plántulas embrionarias preformadas desarrolladas a partir de células. Estos diferentes fenómenos ocurren en respuesta a la fuerza total del medio, a la forma en que se suministra el nitrógeno, a las condiciones de iluminación, y también a la naturaleza del estímulo del factor de crecimiento. El significado esencial de los trabajos hechos en este y en muchos otros laboratorios es, sin embargo, el siguiente.

Cada célula diploide viva del soma de una angiosperma debe de contener en su núcleo toda la información genética original y, potencialmente, el dispositivo citoplásmico para transcribirla, con tal que estímulos exógenos apropiados liberen a la célula de cualesquiera limitaciones o inhibiciones endógenas adquiridas durante su diferenciación *in situ*, o necesarias para esta diferenciación. Una vez hecho esto, la ligazón entre uno y otro ciclo de crecimiento vegetativo puede establecerse repetidamente a nivel de las células somáticas libres [11, 24].

Comportamiento de los orgánulos autónomos

Todavía queda otro punto en relación con los orgánulos celulares. Los estímulos que hacen proliferar y crecer las células quiescentes de la zanahoria afectan también de diversos modos a sus orgánulos: mitocondrias, plastos, dictiosomas, retículo y agregados polisómicos de ribosomas del citoplasma fundamental [25, 26]. Los mismos estímulos influyen en el metabolismo del tejido y en su capacidad para formar productos bioquímicos residuales o secundarios. Es obvio el gran interés práctico que tendría lograr a voluntad un determinado atributo bioquímico-genético y hacer que las células de las angiospermas creasen unas características bioquímicas determinadas sin pasar por las acostumbradas fases previas de crecimiento y morfogénesis. Hasta ahora, ello ha resultado dificilísimo de lograr [27]. De hecho, la bioquímica especializada suele presentarse como la consecuencia, y no como la causa, de la forma especial de organografía con la cual está comúnmente asociada, como puede deducirse de las observaciones sobre los plastos de zanahoria.

En la raíz de esta planta hay plastos rojo anaranjados ricos en caroteno, pero incluso éstos se tornan de color verde brillante en los explantes cultivados a la luz en leche de coco. La combinación de intensidad luminosa y temperatura y de las fluctuaciones diurnas de ambos factores influyen sobre la pigmentación, pero ninguna de ellas ha podido producir en las células libres ni en los explantes en proliferación el vivo rojo-anaranjado que tienen las células, ricas en caroteno, de la raíz normal de zanahoria. Estirpes de esta especie pueden incluso producir células libres, quizá más ricas en clorofila (contenida en cloroplastos perfectamente normales) que las hojas de dicha planta [28]. Pero el único modo de

reproducir las células rojo-anaranjadas de la raíz de la zanahoria es recrear, en miniatura, para las células, el emplazamiento morfológicamente correcto. Esto se hizo «sembrando» células libres en agar, y dejándolas organizarse cuando las plántulas formaban cloroplastos en sus brotes, leucoplastos en sus ápices radiculares y ricos cromatóforos rojos en las vainas de los haces de las raíces tuberosas en desarrollo (Fig. 9 (a–c)). Así, pues, la naturaleza de las células potencialmente totipotentes no es el único factor que determina lo que harán, ni cúan fácilmente puedan iniciar su crecimiento, sino que también influye en ello el sitio donde morfológicamente se desarrollen.

Lugares y modos de acción de las sustancias reguladoras del crecimiento

¿Qué pistas hay respecto de los procesos por los que células, en otro caso totipotentes, responden a los mensajes exógenos que reciben? Sería satisfactorio si, en respuesta a los estímulos adecuados, los genes nucleares ...rtiesen ARN-mensajeros en el citoplasma, y allí éstos estimulasen a las proteínas y enzimas apropiados para que las células cumpliesen su misión, donde y cuando debiesen hacerlo. Puede observarse cómo actúa normalmente en las fanerógamas este mecanismo de carácter esencialmente bacteriano, si bien, hasta ahora han tenido poco éxito los intentos hechos para demostrarlo [23]. En realidad, parece como si las células de zanahoria, en un medio basal, poseyesen inactivos todos los mecanismos para sintetizar proteínas y sólo necesitasen ciertos desencadenadores químicos externos, que se han descrito, para que aquéllos actuasen en el sentido conveniente (*cf.* [12]). Todo esto plantea el problema de saber si las células vegetales necesitan realmente «pedir permiso a sus núcleos» (en cuanto a que intervengan genes activadores o represores) para cada tarea que hayan de cumplir. Del comportamiento de las células de zanahoria parece deducirse que la situación es la siguiente.

La herencia genética del zigoto, transmitida a todas células hijas en el momento de la división, dota a cada orgánulo de la capacidad inherente para realizar sus diversas funciones. Luego, sin embargo, los orgánulos autónomos, cada uno con su propia información genética, pueden ser llevados a realizar una actividad adecuada por el gran arsenal de sustancias simples que, aisladas o combinadas, actúan como reguladores del crecimiento; éstos liberan la inherente totipotencia de las células de las angiospermas. Hay, pues, una vasta área abierta al control químico exógeno sobre las respuestas de células que de otra forma serían totipotentes.

Desarrollo clonal de las células animales y vegetales

Volvamos, por último, a las células animales. Hay ahora sólidos testimonios de que los núcleos de ciertas células animales (p.ej., los de la pared intestinal de un renacuajo) conservan intacta toda la información genética, pero que sólo la liberan, por lo que hasta ahora sabemos, en contacto con el citoplasma de un huevo desnucleado [29]. Quizá en el futuro, técnicas equivalentes a las descritas empleadas con las plantas induzcan a las células somáticas animales a iniciar un desarrollo embrionario y, quizá, si esto sucede, se les pueda hasta proporcionar de algún modo un equivalente del suministro de sangre parental. Es indiscutible que tales pasos presentan, sin embargo, dificultades de mayor orden, incluso si no constituyen barreras insuperables al libre desarrollo clonal de los animales superiores a partir de células somáticas. Así, pues, hasta que estos problemas no presenten indicios de resolución, parece lo mejor considerar que el crecimiento clonal libre de los animales superiores a partir de células somáticas no es sino una meta deseable. Sin embargo, mientras tanto las técnicas del desarrollo clonal de plantas a partir de células libres [13, 30] nos ofrecen diversas posibilidades técnicas prometedoras.

El autor queda agradecido a los investigadores asociados y ayudantes que participaron en la labor original y desea agradecer su ayuda material y financiera a los *National Institutes of Health, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Bethesda, Md.*

Referencias

[1] Haberlandt, G. *Sber. K. Akad. Wiss. Math-naturwiss.* Kl., 111, Sec. 1, 69, 1902.
[2] *Idem. Sber. preuss. Akad. Wiss.*, 40, 695, 1921.
[3] Krikorian, A. D. *Bot. Rev.*, 35, 1, 59, 1969.
[4] Stephens, L. C. *Devl. Biol.*, 2, 285, 1960.
[5] Willis, R. A. En «The Borderland of Embryology and Pathology», pág. 456. Butterworths, Washington, 1962.
[6] Caplin, S. M. y Steward, F. C. *Nature, Lond.*, 163, 920, 1949.
[7] Steward, F. C., Caplin, S. M. y Millar, F. K. *Ann. Bot.*, N.S. 16, 58, 1952.
[8] Steward, F. C. y Shantz, E. M. En «The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances», pág. 165. Academic Press, Nueva York. 1956.
[9] Steward, F. C., Mapes, M. O. y Mears, K. *Am. J. Bot.*, 45, 705, 1958.
[10] Steward, F. C. *Ibid.*, 45, 705, 1958.
[11] Steward, F. C. y Mapes, M. O. *J. Indian bot. Soc.* 42A, 237, 1963.
[12] Steward, F. C. *et al. Science, N.Y.*, 143, 20, 1964.
[13] Steward, F. C., En «Plant Physiology—A Treatise», pág. 329. Academic Press, Nueva York. 1969.
[14] Steward, F. C. y Caplin, S. M. *Science, N.Y.*, 113, 518, 1951.
[15] Shantz, E. M. y Steward, F. C. Resumen en «Growth and Organization in Plants» por F. C. Steward, pág. 173. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass. 1968.
[16] Degani, N. y Steward, F. C. *Ann. Bot.*, N.S., 33, 483, 1969.
[17] Steward, F. C. y Degani, N. *Ibid.*, 33, 615, 1969.
[18] Steward, F. C., Kent, A. E. y Mapes, M. O. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 144, 326, 1967.
[19] Nitsch, J. P. y Nitsch, C. *Science, N.Y.* 163, 85, 1969.
[20] Sunderland, N. y Wickes, F. M. *Nature, Lond.*, 224, 1227, 1969.
[21] Steward, F. C. *Phytomorphology*, 17, 499, 1967.
[22] Ammirato, P. V. Tesis doctoral, Cornell University, Ithaca, N.Y. 1969.
[23] Steward, F. C. *Proc. roy. Soc., B.*, 175, 1, 1970.
[24] *Idem.* «Growth and Organization in Plants», *cf.* págs. 478–9. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass. 1968.
[25] Israel, H. W. y Steward, F. C. *Ann. Bot.*, N.S. 30, 63, 1966.
[26] *Idem. Ibid.*, 31, 1, 1967.
[27] Krikorian, A. D. y Steward, F. C. En «Plant Physiology—A Treatise», pág. 227. Academic Press, Nueva York. 1969.
[28] Israel, H. W., Mapes, M. O. y Steward, F. C. *Am. J. Bot.*, 56, 910, 1969.
[29] Gurdon, J. B. *Endeavour*, 25, 95, 1966.
[30] Steward, F. C., Ammirato, P. V. y Mapes, M. O. *Ann. Bot.*, N.S. (En prensa).